

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 15/04/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**PROTEÔMICA DO FLUÍDO UTERINO E DO EMBRIÃO DURANTE
A GESTAÇÃO INICIAL EQUINA**

RUBIA ALVES SCHMITH

Botucatu - SP
Abril/2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**PROTEÔMICA DO FLUÍDO UTERINO E DO EMBRIÃO DURANTE
A GESTAÇÃO INICIAL EQUINA**

RUBIA ALVES SCHMITH

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Cezinande de Meira
Coorientadora: Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Botucatu - SP

Abril/2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Schmith, Rubia Alves.

Proteômica do fluído uterino e embrião durante a
gestação inicial / Rubia Alves Schmith. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Cezinande de Meira

Coorientador: Fabiana Ferreira de Souza

Capes: 50504002

1. Gravidez. 2. Endométrio. 3. Espectrometria de massa.
4. Proteínas.

Palavras-chave: Endométrio; Espectrometria de massas;
Gestação; Proteína; Reconhecimento-materno.

Nome do autor: Rubia Alves Schmith

Título: **PROTEÔMICA DO FLUÍDO UTERINO E DO EMBRIÃO DURANTE A GESTAÇÃO INICIAL EQUINA**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cezinande de Meira

Presidente e orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ, UNESP, Botucatu - SP

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Membro titular

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ, UNESP, Botucatu - SP

Profa. Dra. Priscilla do Nascimento Guasti

Membro titular

Departamento de Reprodução Animal - Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral - FAEF – Garça - SP

Profa. Dra. Fernanda Saules Ignácio

Membro titular

Departamento de Reprodução Animal - Faculdade Eduvale - Avaré - SP

Profa. Dra. Fernanda Maria Pazinato

Membro titular

Departamento de Clínicas Veterinárias - Universidade do Oeste de Santa Catarina - UNOESC - Xanxerê - SC

Data da Defesa, 15 de abril de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por todo apoio e incentivo em cada decisão tomada, sem vocês eu nunca chegaria até aqui.

Ao meu orientador, professor Meira, por conversar muito comigo e nunca negar ajuda quando precisei. Agradeço ainda por todo crescimento profissional e pessoal que aprendi nesse tempo de convivência com o senhor.

A professora Fabiana, por me acolher assim que iniciei a pós-graduação, por me ensinar tudo no laboratório, por me incentivar quando tudo estava dando errado. Muito obrigada por tudo.

Aos meus amigos que sempre estiveram comigo para a realização deste trabalho, muito obrigada por toda ajuda e incentivo, sem vocês não seria possível a realização deste trabalho.

A todos os professores, laboratórios e funcionários do departamento de cirurgia veterinária e reprodução animal da FMVZ. Obrigada por sempre estarem a disposição em ajudar na realização deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“A alegria que se tem em pensar e aprender
faz-nos pensar e aprender ainda mais”
Aristoteles*

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ca	Cálcio
CL	Corpo lúteo
COX	Cicloxigenase
COX-1	Cicloxigenase-1
COX-2	Cicloxigenase-2
EqIFN- δ 1	Interferon equino delta 1
EqIFN- δ 2	Interferon equino delta 2
GM2AP	Proteína ativadora de GM2
HSP10	Proteína de choque térmico 10
HSP60	Proteína de choque térmico 60
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
mm	Milímetro
mL	Mililitro
mOsm	Miliosmol
ng	Nanograma
OXTR	Receptor de ocitocina
P4	Progesterona
P19	Uterocalina
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PGFM	13,14-dihidro-15-ceto PGF2 α
pl	Ponto isoelétrico
PTGS1	Prostaglandina endoperoxido sintase 1
PTGS2	Prostaglandina endoperoxido sintase 2
PLA2	Fosfolipase A2

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1. Fertilização	2
2.2. Clivagem e compactação.....	3
2.3. Desenvolvimento embrionário	3
2.4. Formação da cápsula embrionária.....	5
2.5. Mobilidade Embrionária	7
2.6. Reconhecimento materno da gestação	10
2.7. Implantação	12
2.8. Proteômica do endométrio e histotrofo	14
REFERÊNCIAS.....	17
OBJETIVOS	32
CAPÍTULO 2 - Proteínas do fluido uterino de éguas e sua relação no início da migração embrionária	33
1. Introdução.....	35
2. Materiais e métodos.....	36
2.1. Reagentes	36
2.2. Aspectos éticos.....	36
2.3. Seleção de Animais	37
2.4. Modelo experimental.....	37
2.5. Colheita do Líquido uterino e dos embriões.....	37
2.6. Proteômica.....	39
2.7. Ontologia gênica	41
2.8. Análise dos dados.....	41
3. Resultados.....	41
4. Discussão	47
Conflitos de interesse.....	51

Agradecimentos	51
Contribuição dos autores	51
Referências	51
Anexos.....	57

RESUMO

SCHMITH, R. A. **Proteômica do fluido uterino e embrião durante a gestação inicial**. Botucatu, 2020, 100 p., Doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu.

O presente estudo teve como objetivo descrever o perfil proteico do embrião equino e do fluido uterino durante a fase inicial do reconhecimento materno da gestação. Foram utilizadas 10 éguas, sem anormalidades uterinas, de 5 a 8 anos de idade. O acompanhamento folicular diário foi realizado até a detecção de um folículo (35 mm) para indução da ovulação, o dia seguinte realizava a inseminação artificial e posteriormente o D0 sendo o dia da ovulação da égua. O líquido uterino foi colhido, usando tampão vaginal comercial de humanos nos dias 7 (D7), 10 (D10) e 12 (D12) de gestação. Nos mesmos períodos, após a retirada do tampão vaginal, os embriões foram colhidos por fluxo retrógrado utilizando-se tampão fosfato-salina pH 7,2. O processamento do líquido uterino foi de centrifugação e dos embriões foram sonicação e centrifugação para proteômica. A concentração de proteína total foi determinada e uma alíquota (50 µg) foi digerida “*in solution*” com tripsina, seguida da análise por espectrometria de massas. Após a análise estatística multivariada, foram identificadas 171 proteínas, sendo 29 no embrião e 142 no líquido uterino. Foram encontradas 15 proteínas mais abundantes nos embriões, sendo 10 no D10 e 5 no D12. Já no líquido uterino, 6 proteínas foram mais abundantes no D7, 3 no D10 e 6 no D12. As principais funções moleculares foram atividade catalítica e de ligação e os processos biológicos mais significativos foram o processo celular e metabólico. Este estudo descreveu proteínas que foram abundantes no fluido do endométrio e no embrião equino, fornecendo indicações sobre a nutrição e metabolismo embrionários e fatores pré-implantação no período de reconhecimento materno da gestação.

Palavras-chaves: endométrio, espectrometria de massas, gestação, proteína, reconhecimento-materno

ABSTRACT

SCHMITH, R. A. (2020). **Proteomics of uterine fluid and embryo during initial pregnancy**. Botucatu, 2020, 100 p., PhD, São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho", School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu.

The aim of this study was to describe the protein profile of the equine embryo and uterine fluid, during the maternal recognition of pregnancy. Ten mares from 5 to 8 years of age, without uterine abnormalities were used. Daily follicular monitoring was performed until the detection of the preovulatory follicle (35 mm) to induce ovulation, the next day performed artificial insemination and then D0 was the mare's ovulation day. The uterine fluid was collected using commercial human vaginal tampon at 7 (D7), 10 (D10) and 12 (D12) of the gestation. In the same moments, after withdraw vaginal tampon, the embryos were collected by retrograde flushing using phosphate-saline buffer pH 7.2. The processing of the uterine fluid was centrifugation and the embryos were sonicated and centrifuged for proteomics. The total protein concentration was determined and an aliquot (50 µg) was digested "in solution" with trypsin, followed by analysis by mass spectrometry. After data analysis by multivariate statistical, 171 proteins were identified, 29 in the embryo and 142 in the uterine fluid. Fifteen abundant proteins were found in the embryos, 10 proteins in the D10 and 5 in the D12. In the uterine fluid, 6 proteins were more abundant in the D7, 3 in the D10 and 6 in the D12. The main molecular functions were catalytic and binding activity and the most significant biological processes were the cellular and metabolic processes. This study described proteins that were abundants in the uterine fluid and the equine embryo, providing indications about the embryonary nutrition, metabolism, and pre-implantation factors in the period of maternal recognition of pregnancy.

Key words: endometrium, mass spectrometry, gestation, protein, maternal-recognition

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nos mamíferos, o sucesso do estabelecimento da gestação depende da sanidade uterina (GINTHER, 1985b) e da comunicação entre o endométrio e o conceito para que ocorra a implantação embrionária (KLEIN, 2016). Contudo, a mobilidade embrionária na espécie equina, sendo alvo de maior estudo com relação ao reconhecimento materno da gestação. E desta forma, mais estudos são necessários para elucidar as interações entre o útero e o embrião na espécie equina.

Diferentemente de outras espécies, como humanos (EVANS et al., 2019) que possuem um fator luteotrófico produzido e liberado pelo conceito, ou como em ruminantes (MORAES et al., 2020) e suínos (GEISERT et al., 2017) que liberam fatores antiluteolíticos, nos equinos ainda não se sabe exatamente os mecanismos de comunicação entre o conceito e a fêmea. A mobilidade embrionária intrauterina é a principal característica do reconhecimento materno em equino, a qual o distingue de outras espécies (GILBERT, 2010).

Estudos sobre os mecanismos de reconhecimento materno da gestação são essenciais para a espécie equina, já que 17% das perdas gestacionais ocorrem próximas ao período de fixação do embrião (ALLEN, 2001). As funções e os processos biológicos, assim como vias metabólicas e antiluteolíticas podem explicar a perda da gestação e identificar marcadores do reconhecimento materno da gestação (SMITS et al., 2018). Desta maneira, a proteômica é uma ferramenta que pode contribuir para determinar as vias envolvidas no reconhecimento materno da gestação de equinos (SWEGEN et al., 2017).

Baseado nisso, a proposta deste estudo é identificar e quantificar as proteínas do embrião e do fluido uterino equino durante as fases iniciais do reconhecimento materno da gestação usando abordagem proteômica, na tentativa de estabelecer relações entre o conceito e o útero durante a fase de maior mobilidade embrionária e início do reconhecimento materno da gestação. Ainda, pretende-se identificar fatores antiluteolíticos liberados pelo conceito e compreender as vias do processo inicial da gestação. Dessa forma, os resultados poderão servir de embasamento para obtenção de marcadores que permitam estabelecer os mecanismos do reconhecimento inicial da gestação equina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Fertilização

A reprodução e a embriogênese no equino possuem características únicas que as diferenciam de outras espécies de animais domésticos, roedores e humanos (BETTERIDGE, 2007).

Após a ruptura do folículo, o oócito é capturado pelas fimbrias da tuba uterina e atinge rapidamente a junção istmo-ampolar, local da fertilização (GINTHER, 1992). Os espermatozoides migram até este local e a fecundação ocorre quando há fusão da zona pelúcida do oócito com a cabeça espermática (HAFEZ; HAFEZ, 2004; CAIXETA et al., 2008).

A ligação dos gametas é um processo coordenado por receptores proteicos específicos no oócito e no espermatozoide. A zona pelúcida é sintetizada pelo oócito em maturação, sendo sua matriz extracelular constituída por glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2 e ZP3, presentes em todas as espécies de mamíferos. ZP1 e ZP2 são glicoproteínas estruturais, enquanto ZP3 atua como receptor espermático (HERRLER et al., 2000). Apenas espermatozoides com acrossomo intacto podem se ligar à ZP3. A ligação da cabeça espermática à ZP3 permite interações com outras zonas que estimulam a reação do acrossomo, liberando enzimas que promovem uma abertura da zona pelúcida para que o espermatozoide possa atingir a membrana vitelínica (GADELLA, 2008). A região equatorial da cabeça espermática liga-se à membrana vitelínica estimulando o oócito à retomada da segunda divisão meiótica, liberando o segundo corpúsculo polar (GINTHER, 1992; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A fecundação induz uma série de oscilações (ondas) intracelulares de Ca^{+2} que promovem alterações citoplasmáticas e nucleares no oócito, essenciais para o início da embriogênese. As principais funções são: a exocitose dos grânulos corticais, a descondensação da cabeça do espermatozóide, a finalização da meiose com a expulsão do segundo corpúsculo polar e a formação do pronúcleo masculino e feminino. (GINTHER, 1992).

Particularidade do embrião equino é a liberação de PGE para abertura da junção útero tubárica, assim podem sair os oócitos não fertilizados de ciclos anteriores. (FLOOD; JONG; BETTERIDGE, 1979; ALLEN, 2000).

2.2. Clivagem e compactação

Após o estadio de zigoto, os embriões sofrem uma série de divisões mitóticas. A primeira clivagem do embrião equino ocorre 24 horas após a fecundação (HERRLER et al., 2000). Nas divisões celulares não ocorre aumento da massa celular. O diâmetro de um embrião clivado, de um zigoto e um oócito pré-ovulatório não se alteram até a formação da blastocela (GINTHER, 1992; BETTERIDGE, 2000). A clivagem do zigoto inicia-se por divisão e as células irmãs resultantes são denominadas blastômeros. As divisões iniciais ocorrem simultaneamente em todos os blastômeros, e posteriormente a sincronização é perdida (GINTHER, 1992).

No estadio de 8 células, os blastômeros formam um arranjo frouxo, com espaço abundante entre eles. Na terceira clivagem há alteração desse comportamento e os blastômeros se aglomeram e aumentam o contato, formando uma massa esférica compacta de células. O arranjo compacto é estabilizado por junções do tipo “gap” que se formam entre as células externas da massa celular, permitindo o transporte de pequenas moléculas e íons (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Aproximadamente 4 a 5 dias após a fecundação, o embrião apresenta 16 a 32 células (GINTHER, 1992) e neste período é denominado mórula (HERRLER et al., 2000). No 5º dia após a ovulação o embrião está na fase de mórula compacta e começa a secretar prostaglandina E_2 (PGE_2). A PGE_2 estimula o relaxamento da musculatura lisa da tuba uterina, permitindo que o embrião se mova progressivamente com o auxílio do batimento ciliar rítmico, entrando no útero (WEBER et al., 1991; WEBER; WOODS; LICHTENWALNER, 1995; BATTUT et al., 1998; GASTAL et al., 1998).

2.3. Desenvolvimento embrionário

Em geral o embrião passa pela papila útero-tubárica e chega ao útero aproximadamente 6 dias após a ovulação, no seu estágio de desenvolvimento entre mórula ou blastocisto inicial, apresentando uma zona pelúcida e o início da formação de uma cápsula de glicoproteína acelular (MCKINNON et al., 2011).

O trofoblasto é constituído por células colunares com microvilosidades que auxiliam na captação de nutrientes. Posteriormente, este grupo celular originará a porção embrionária da placenta. Já o embrioblasto, que é formado a partir da massa celular interna, formará o embrião contendo as camadas

germinativas (GINTHER, 1992). O embrião se expande rapidamente após a migração da tuba e entrada no útero, ocorrendo uma diminuição progressiva na espessura da zona pelúcida até o seu total desaparecimento. Quando no útero, em poucos dias, a zona pelúcida vai se desfazendo da cápsula, a qual permanece revestindo completamente o embrião (CROSSETT et al., 2005; STOUT; MEADOWS; ALLEN, 2005).

A gastrulação, primeira mudança morfogênética que um embrião sofre em seu desenvolvimento, é o período no qual ocorre a transição de uma esfera simples e não estruturada de células para um conceito organizado e de múltiplas camadas distinguíveis, contendo todos os principais precursores dos tecidos do organismo adulto, como endoderme, mesoderme e ectoderme (NARASIMHA; LEPTIN, 2000; MYERS; SEPICH; SOLNICA-KREZEL, 2002; CHUAI; WEIJER, 2009). O primeiro evento da diferenciação durante o desenvolvimento embrionário é o distanciamento do trofotoderma da massa celular interna. Rapidamente a cavidade do blastocisto começa a ampliar-se e definir-se, demarcando em um dos pólos a massa celular interna (BETTERIDGE, 2007; GAIVÃO et al., 2014).

As células da massa celular interna se diferenciam em camadas internas e externas para formar o disco embrionário bilaminar (SOLNICA-KREZEL, 2005; GILBERT, 2010; VEJLSTED, 2010). A camada interna do disco embrionário (hipoblasto) estará formada aproximadamente no 12º dia e dará origem as estruturas extraembrionárias (SOLNICA-KREZEL, 2005; VEJLSTED, 2010). O hipoblasto é derivado das células que migram da massa celular interna e seguem para se alinhar na cavidade da blastocela, completando o saco vitelino bilaminar (GILBERT, 2010). O epiblasto está localizado acima do hipoblasto e possui células progenitoras do embrião. Quando se desenvolve um espessamento e alongamento do epiblasto é formada a linha primitiva, e o futuro eixo longitudinal do corpo (GAIVÃO et al., 2014). Ao longo da linha primitiva, as células do epiblasto migram para a linha média, para serem transformadas em células do mesoderma ou endoderma. Algumas células precursoras desta linhagem são incorporadas no hipoblasto formando o endoderma definitivo. Já as células epiteliais remanescentes se diferenciam em ectoderma (GILBERT, 2010; DEGRELLE et al., 2011). No 14º dia de desenvolvimento, uma terceira membrana emerge do disco embrionário entre a ectoderme e a endoderme para

formar o saco vitelino trilaminar (MCKINNON et al., 2011). Entre o 10° até o 16° dia o crescimento embrionário é aproximadamente 3,4 mm por dia, e a entrada de líquidos chega até 3 mL no 16° dia (WAELCHLI; BETTERIDGE, 1996).

Após a migração dos precursores do mesoderma e do endoderma pela linha primitiva, as camadas germinativas se diferenciam para gerar tecidos específicos ao longo dos eixos embrionários. A ectoderme vai dar origem a epiderme e os tecidos neurais, a camada interna (endoderme) desenvolve o trato digestivo e o mesoderma vai produzir os demais órgãos, tecido conjuntivo e células sanguíneas (SOLNICA-KREZEL, 2005). Um pequeno sulco na linha média do disco bilaminar vai se alongando e definindo o eixo anteroposterior e a futura cabeça e cauda do embrião. Em geral, o endoderma é internalizado antes do mesoderma, e as células endodérmicas migram individualmente (IDKOWIAK et al., 2004; DEGRELLE et al., 2011).

Algumas partes do ectoderma e mesoderma passam pelo disco embrionário e formam o saco amniótico que envolve inicialmente o embrião. Na região posterior do intestino surgirá o saco alantoidiano, cujo crescimento será direcionado ventralmente ao embrião. Em seguida, outras porções do endoderma e mesoderma irão formar o córion, a placenta (córion - alantoide) e que posteriormente desenvolveram a cinta coriônica, finalizando a formação embrionária e dos anexos fetais (SOLNICA-KREZEL, 2005).

2.4. Formação da cápsula embrionária

Em torno de 6,5 dias após a ovulação, é observada uma cápsula entre o trofotoderma e a zona pelúcida, coincidindo com a blastulação e a entrada do embrião em desenvolvimento no útero (BETTERIDGE et al., 1982). À medida que a zona pelúcida se torna mais fina e os embriões se expandem em tamanho, a zona pelúcida é absorvida, sendo a cápsula a única camada que envolve o embrião. A função da cápsula é semelhante à da zona pelúcida; manter o embrião na sua forma esférica durante o período do reconhecimento materno da gestação, uma característica da espécie equina (GINTHER, 1992).

Embora fina, a cápsula de glicocálix é resistente, flexível e elástica funcionando como uma proteção física ao conceito durante a fase de migração, permitindo com a movimentação de uma extremidade à outra dos cornos uterinos (ORIOLO; SHAROM; BETTERIDGE, 1993; BETTERIDGE, 2000; STOUT;

MEADOWS; ALLEN, 2005; ARAR et al., 2007; QUINN et al., 2007; TACHIBANA et al., 2014), ao atuar como uma camada anti-adesiva devido a sua alta concentração de ácido siálico (CHU et al., 1997; STOUT; MEADOWS; ALLEN, 2005). O ácido siálico é constituído de glicoproteínas carregadas negativamente, as quais propiciam efeito antiaderente e regulador do movimento intrauterino do embrião, auxiliando no acúmulo e captação de secreções endócrinas e exócrinas (DENKER et al., 2000; ALLEN; WILSHER, 2009). As secreções do endométrio contêm a uterocalina e a uteroglobina, que são proteínas de transporte de nutrientes para o embrião, incorporadas na cápsula nos primeiros dias de gestação (MCDOWELL et al., 2004). O peso seco da cápsula aumenta até o 18º dia de gestação, mas ainda não foi esclarecido se essa produção é contínua ou decorrente do acúmulo de proteínas ligadas a esta camada (ORIOLE; SHAROM; BETTERIDGE, 1993).

A manutenção da forma esférica, uma característica do embrião equino (ALLEN; WILSHER, 2009) e o período prolongado de migração uterina estão ligados à supressão da secreção de $\text{PGF2}\alpha$ pelo endométrio e reconhecimento materno da gestação (MCDOWELL et al., 1988).

A cápsula é fundamental para a sobrevivência do embrião, a qual proporciona resistência mecânica à estrutura, suportando as forças propulsoras do miométrio durante a fase de mobilidade embrionária (STOUT; MEADOWS; ALLEN, 2005). A fixação do embrião no local da placentação está associada com a fluidez e com o padrão de ligação de proteínas e o mecanismos enzimáticos que dissolvem a cápsula (ORIOLE et al., 1993; CHU et al., 1997; DENKER HW, 2000; ARAR et al., 2007; QUINN et al., 2007). Não se sabe exato o dia ou como ocorre a degradação da cápsula embrionária, porém, aos 18 dias após a ovulação, os embriões podem ser recuperados com a cápsula intacta ou em fragmentos por vários dias após. Logo, estima-se que no dia 21 é quando há a degradação desta porção embrionária (DENKER; BETTERIDGE; SIROIS, 1987; ENDERS; LIU, 1991a).

A cápsula também atua como defesa biológica contra-ataques virais, bacterianos ou componentes imunológicos maternos. Cápsulas com defeitos mostraram que a ausência ou alteração do perfil de proteínas impedem a

redução das concentrações de ácido siálico com posterior dissolução da capsula, interferindo no processo de fixação embrionária (ARAR et al., 2007).

A capsula é formada principalmente pela microglobulina $\beta 2$, a qual está associada com a fixação do embrião. Contudo outras proteínas podem ser encontradas, como a fosfolipase A2 e a proteína beta 2M que sofrem uma degradação progressiva (QUINN et al., 2007).

Durante a expansão do embrião a capsula é responsável por aumentar a captação de glicose, frutose, água e íons como substratos energéticos (LANE et al., 2001). A produção de glicose pelo útero da égua se mantém estável durante o início da gestação, com aproximadamente 5 a 6 mg (ZAVY et al., 1982). Porém, o embrião estimula ativamente a expressão de transportadores específicos de glicose e frutose no útero contribuindo para maior captação dos substratos energéticos (GIBSON et al., 2018). Outro componente do sistema de trocas entre o embrião e a égua é o saco vitelínico. Antes da fixação, há expressão da proteína ativadora de GM2 (GM2AP), a qual é responsável pelo transporte e catabolismo de lipídeos e fosfolipídeos (QUINN et al., 2006). A parede do saco vitelino também produz a proteína 3 que se liga ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-like) que é necessário para o desenvolvimento embrionário (HERRLER et al., 2000), síntese e metabolização de esteroides (GOFF et al., 1993; RAESIDE et al., 2004), além da $\text{PGF}2\alpha$ e PGE_2 (STOUT; ALLEN, 2002).

2.5. Mobilidade Embrionária

Um dos principais determinantes do ambiente uterino adequado para o estabelecimento da gestação é o fornecimento contínuo de progesterona pelo CL (STOUT, 2016). O principal esteroide sintetizado pelo CL entre 7 a 14 dias após ovulação é a 17α -hidroxiprogesterona (GOFF et al., 1993). A progesterona reduz a contratilidade uterina e assegura o reconhecimento materno da gestação no período pré-implantação (HOLTAN et al., 1991; LYE et al., 1998; CHALLIS et al., 2000). Além disso, este hormônio é responsável pela produção de conteúdo histotrófico pelo endométrio, o qual é fonte nutricional primária do embrião até a placentação (AURICH; BUDIK, 2015).

Baixas concentrações de progesterona são incompatíveis com a manutenção da gestação acima de 2 ng/mL. Maior sobrevivência embrionária é

observada com concentrações acima de 4 ng/mL (GINTHER, 1985a; BALL et al., 1986; ALLEN, 2001). Em éguas com ciclos aluteais induzidos (ambiente com progesterona < 1,0 ng/mL), o desenvolvimento embrionário é comprometido, com menor diâmetro dos embriões, estágio embrionário mais precoce e de menor qualidade (LEISINGER et al., 2018).

A progesterona é importante para o transporte embrionário em muitas espécies (camundongo, vacas e humanos), já que regula o batimento ciliar das tubas uterinas facilitando o transporte dos embriões até o útero. Porém nos equinos, a PGE₂ secretada pelo embrião é responsável pelo relaxamento da musculatura lisa das tubas uterinas e transporte embrionário até o útero (WESSEL; SCHUCHTER; WALT, 2004; STOUT, 2006; BYLANDER et al., 2010). Dentro do útero, o embrião equino se movimenta livremente e a mobilidade intrauterina é a primeiro processo do mecanismo de inibição luteolítica (GINTHER, 1983a; STOUT; ALLEN, 2001).

A mobilidade embrionária intrauterina é a principal característica do reconhecimento materno em equino, a qual o distingue de outras espécies. Aproximadamente 60% do tempo, entre os dias 9 e 11, os embriões estão localizados no corpo uterino (GILBERT, 2010). A menor mobilidade é observada no dia 9 após a ovulação e ocorrendo o seu aumento progressivo até a máxima mobilidade entre os dias 11 e 14. O embrião passa por todo útero a cada 2 horas (GINTHER, 1983a; LEITH; GINTHER, 1984). A taxa média de movimento da vesícula embrionária foi estimada em 3,4 mm/min (GINTHER, 1983a). Conceptos gêmeos se movem independentemente indicando que o próprio embrião estimula a contratilidade (GINTHER, 1984). A restrição da mobilidade para menos de dois terços da superfície endometrial resulta na perda da gestação. (GINTHER, 1983a; STOUT; ALLEN, 2001). As contrações e as dobras miométrais facilitam a mobilidade da vesícula, mecanismo que está relacionado com a produção e liberação de PGE₂, PGF₂α e PGI-2 pelo embrião e endométrio, promovendo as contrações que impulsionam a vesícula (KASTELIC; ADAMS; GINTHER, 1987; GASTAL et al., 1998).

As prostaglandinas são essenciais na mobilidade embrionária e são produzidas a partir do ácido araquidônico, via enzima ciclooxygenase (COX), que está presente na membrana das células endometriais (BERRIDGE; IRVINE,

1984; NEEDLEMAN et al., 1986; SHIMIZU; WOLFE, 1990; BERTAN; BINELLI; MADUREIRA, 2006). Há duas isoformas da enzima, a COX-1 e a COX-2 (HABENICHT et al., 1985). No início da gestação, a COX-1 é regulada positivamente no endométrio das éguas, enquanto a expressão de COX-2 é diminuída (ATLI et al., 2010). No embrião de 8 a 14 dias, a expressão de COX-1 é constante e em baixos níveis. A COX-2 atinge os maiores níveis nos dias 12 a 14, o que poderia estar associado com maior mobilidade embrionária (HANDLER et al., 2003; AURICH; BUDIK, 2004). O embrião expressa ambas as COXs, e na inibição seletiva da COX-2, a COX-1 pode manter a produção de prostaglandina suficiente para estimular a contração uterina e promover a mobilidade. Os fatores liberados pelo embrião são insuficientes para induzir a luteólise porque não atingem a circulação e atuam apenas no local (MCDOWELL et al., 1988; STOUT; ALLEN, 2002; EALY; EROH; SHARP, 2010).

Nas éguas não-gestantes no 14º dia após a ovulação, a ocitocina ao se ligar no seu receptor endometrial estimula a liberação de PGF2 α , estabelecendo uma retroalimentação positiva com a hipófise, resultando na luteólise funcional e posteriormente a regressão estrutural do corpo lúteo, fazendo com que a égua retorne a um novo ciclo (KINDAHL et al., 1982; GINTHER, 1985b). A ocitocina desempenha um papel central na regulação da liberação de PGF2 α durante a luteólise, e a expressão alterada de seu receptor é um aspecto integral do reconhecimento materno da gestação. A produção de ocitocina foi verificada nas células epiteliais luminiais e glandulares superficiais do endométrio (BAE; WATSON, 2003). Os níveis de ocitocina são baixos durante a ovulação e no início do diestro, com elevação das concentrações séricas na fase lútea média e tardia (BEHRENDT-ADAM et al., 1999). In vitro, a suplementação de ocitocina no meio de cultivo de células endometriais resultou em maior liberação de PGF2 α (EALY; EROH; SHARP, 2010). Os níveis de transcritos dos receptores de ocitocina no endométrio não diferem entre as éguas gestantes e não-gestantes no momento da luteólise (KLEIN et al., 2010; DE RUIJTER-VILLANI; VAN TOL; STOUT, 2015), mas os níveis proteicos são menores em éguas gestantes quando comparados a éguas não-gestantes (SHARP et al., 1997; STARBUCK et al., 1998).

2.6. Reconhecimento materno da gestação

Nas éguas gestantes o reconhecimento materno é baseado na comunicação do concepto com a fêmea, que ocorre em vista do movimento da vesícula embrionária ao longo do lúmen uterino, fixação e orientação da vesícula para que o polo embrionário se localize na região mesométrica do útero (ALLEN; STEWART, 2001). A comunicação bem-sucedida entre o concepto e a égua estimula a contínua secreção de progesterona, levando a um ambiente uterino receptivo (MCCRACKEN; GLEW; SCARAMUZZI, 1970; ROBERTS; XIE; MATHIALAGAN, 1996).

O reconhecimento materno da gestação dos equinos difere das outras espécies, em ruminantes podemos identificar o fator parácrino interferon tau que exibe funções antiluteolíticas, já em suínos identificamos os estrógenos derivado dos embriões e atuam no endométrio (BAZER et al. 1997; GEISERT et al. 1990; GINTHER, 1983b; BAZER; OTT; SPENCER, 1998). Em equinos o sinal de reconhecimento da gestação derivado do embrião ainda não foi identificado. Porém, a expressão de dois genes que codificam uma proteína semelhante à família do interferon foi descrita, interferon delta 1 (EqIFN- δ 1) e 2 (EqIFN- δ 2), os quais estão presentes em baixos níveis no início da gestação (COCHET; VAIMAN; LEFÈVRE, 2009). O concepto equino também sintetiza estrógeno durante este período, porém como o hormônio está envolvido no reconhecimento materno da gestação ainda não está claro (BUDIK et al. 2010; COCHET et al. 2009; KLEIN 2015). Os estrógenos são metabolizados a partir do sexto dia de vida, atuando localmente regulando a sua biodisponibilidade. Alguns experimentos foram inconclusivos tentando provar que os estrógenos produzidos pelos conceptos podem prolongar a função do corpo lúteo (KLEIN, 2015).

O embrião cessa o movimento próximo ao dia 16, indicando que reconhecimento ocorre entre os dias 11 a 14 após a ovulação (GINTHER, 1985b; LEITH; GINTHER, 1985; STOUT; ALLEN, 2001). A permanência da função lútea não está associada com a redução dos sítios de ligação da PGF2 α no corpo lúteo, mas com a limitação de liberação de PGF2 α (VERNON et al., 1979). Durante o reconhecimento materno foi evidenciada uma proteína com massa molecular de 1 a 6 kDa, que é capaz de reduzir a produção de PGF2 α (ABABNEH et al. 2000). O concepto diminui, mas não previne a liberação de

PGF2 α uterina durante o início da gestação (BERGLUND et al., 1982; WATSON; SERTICH, 1989; EALY; EROH; SHARP, 2010). As proteínas presentes no fluido do saco vitelino equino e embrionária próximo do reconhecimento materno da gestação (dia 13) foram identificadas e quantificadas. Detectaram a regulação positiva de vários inibidores da síntese de prostaglandinas no fluido uterino de éguas gestantes incluindo PTGR1, GSTP1 e ANXA1. Este foi o primeiro estudo que identificou proteínas que se relacionaram com a interação materno- fetal (SMITS et al., 2018).

O período pré-implantação vem sendo investigado, e diversos estudos sobre vias de sinalização, adesão e a identificação de processos biológico das proteínas evidenciam algumas características do reconhecimento materno da gestação. Contudo, o sinal embrionário para reconhecimento materno na égua ainda é incerto (KLEIN, 2015). A análise de proteínas da blastocle de embriões colhidos no dia 8 após a ovulação e incubados por 48 e 72 horas foi descrita. A principal função molecular detectada foi de tradução e regulação de processos metabólicos, que foi relacionado com o crescimento do embrião (SWEGEN et al., 2017).

A adesão focal desempenha papel importante no desenvolvimento materno-fetal. As alterações na adesão focal pela força mecânica podem estar relacionadas com sensores mecânicos no endométrio. Somente o contato já induzirá uma mudança, porém pode não haver uma resposta (BURGHARDT et al., 2009). As aderências focais e seus efeitos são dependentes da composição e rigidez da matriz extracelular (KATZ et al., 2000; GALBRAITH et al., 2002). Em contrapartida somente o embrião é capaz de suprimir a secreção de PGF, sugerindo que não é apenas o contato de qualquer substância que causa a atenuação da secreção de PGF, mas o próprio embrião é necessário pelo menos por 24 horas para diminuir a liberação de PGF (KLOHONATZ et al., 2019).

Algumas linhas de pesquisa focam no prolongamento da vida útil do CL. O óleo de amendoim ou de coco infundidos no útero prolongam o diestro na égua (WILSHER and ALLEN, 2011). Em contrapartida os estudos que colocaram o endométrio equino em cultivo com contato no óleo de amendoim nos dias 9 e 11 de gestação não causou diminuição na produção de PGF, possivelmente porque neste momento o embrião não atingiu a sua maior mobilidade e consequentemente não ocorreu a sinalização (KLOHONATZ et al., 2019).

A identificação das proteínas do embrião tem como objetivo elucidar quais as moléculas responsáveis pelo reconhecimento materno e determinar quais processos são fisiológicos acontecem durante este período. A presença do fator de gestação precoce, uma proteína imunossupressora e que pode ser detectada no soro 2 dias após a ovulação, pelo teste de inibição da roseta foi caracterizada como uma forma extracelular de heat shock protein 10 – HSP10 (CAVANAGH 1996; TAKAGI et al., 1998; OHNUMA et al. 2000). Os embriões no dia 25 de gestação expressam mais transcritos desta proteína do que nos embriões do dia 8, sendo localizada nas células do trofoblasto (HATZEL et al., 2014).

Um estudo identificou proteínas em embriões equinos a partir do 14º até 100 dias de gestação. Diferenças foram observadas entre as massas de 30 a 40 KDa e polipeptídios de 20 KDa que se assemelham a transferrina e alfa-fetoproteína (MCDOWELL et al., 2004). Os sinais do embrião para o reconhecimento materno não foi determinado, mas sugeriu-se que estas duas proteínas podem estar envolvidas no mecanismo antiluteolítico (MCDOWELL et al., 2004). A alfa-fetoproteína é uma glicoproteína produzida pelo saco vitelínico e fígado fetal e está presente em diversos mamíferos (KASHYAP et al., 2001). Em equinos estudos indicam que a presença desta proteína está associada com o bem-estar do feto (SORENSEN et al., 1990). Nas éguas em que ocorre a perda embrionária ou desenvolvimento de placentite, a expressão da alfa-fetoproteína está aumentada. Já em éguas mais velhas, mas sadias a expressão já se encontra diminuída (CANISSO et al., 2015; VINCZE et al., 2015; VINCZE et al., 2018).

2.7. Implantação

Originalmente a parada da vesícula embrionária ocorre nos dias 15, 16 ou 17 após a ovulação em éguas (GINTHER, 1983a). A fixação do embrião é resultado do aumento da contratilidade uterina e do tamanho da vesícula embrionária que se fixa na base de um dos cornos uterinos (GINTHER, 1983b; GASTAL et al., 1996). Interessantemente, ao mesmo tempo em que o tônus uterino aumenta, o seu padrão contrátil se altera e coincide com o período de fixação do conceito (GASTAL et al., 1996). No dia da fixação o embrião está localizado centralmente em uma visão transversal do corno uterino devido à espessura uniforme da parede uterina. No dia 17 inicia-se a modificação do seu

formato esférico e o embrião passa a ter contornos irregulares e o formato triangular. O ápice se localiza na região dorsal do lúmen uterino, entretanto o embrião não permanece estático, e em seu contorno observam-se mudanças causadas por contrações miométrais que parecem exercer ação compressora da vesícula já fixada (GINTHER, 1983b; GASTAL et al., 1996). Alterações desproporcionais na espessura da parede uterina ocorre entre os dias 16 e 21, enquanto ao mesmo tempo a parede ventral torna-se menos espessa e mais lisa. Portanto, a orientação do embrião é conduzida pela combinação da invasão desproporcional da parede dorsal do útero e por ação do atrito com o útero, forçando a parte mais espessa da parede do concepto, e o polo embrionário se posicionar na porção ventral do útero (GINTHER, 1984).

Em gestações gemelares, 97% dos embriões se fixam entre o dia 16 e o dia 18. Aproximadamente 70% de embriões gemelares se fixam no mesmo corno uterino (GINTHER, 1984). Muitas perdas embrionárias acontecem no momento da fixação do embrião, logo uma melhor compreensão sobre as interações moleculares pode auxiliar no diagnóstico e tratamento de éguas propensas a perda embrionária (HAYES et al., 2008; QUINN et al. 2007). Quando ocorre a luteólise observa-se na cápsula embrionária um aumento da fosfolipase A2. Estas enzimas são responsáveis por clivar glicerofosfolídeos e liberar ácido graxos (BIRTS et al. 2007). Suas sinalizações podem estar relacionadas com a inflamação e hemostasia, assim pode estar ligado a remoção e degeneração da cápsula do embrião (HAYES et al., 2008).

Algumas interações de proteínas no momento da fixação foram estudadas. A lactadherin é uma glicoproteína da membrana do glóbulo de gordura do leite e está presente no endométrio de ratos, humanos e bovinos (CERIANI et al. 1983, BOCCA et al. 2012; KLEIN et al. 2006). Há um aumento da expressão durante a fase do estro e atinge níveis mais elevados durante a implantação do embrião (FRANCHI et al. 2011). Suas funções estão relacionadas com a adesão celular, angiogênese e reabsorção de ácidos graxos (TAYLOR et al.1997; UCHIYAMA et al. 2014; KHALIFEH-SOLTANI et al. 2014; BARUA et al.,2018). Em equinos foi observada a expressão no estro, na fase de reconhecimento materno e no 5º mês de gestação e diferentemente das outras espécies sua expressão se mantém em níveis estáveis (Barua et al.,2018).

2.8. *Proteômica do endométrio e histotrofo*

Apesar de não haver um fator relacionado com o reconhecimento materno da gestação em equinos, algumas proteínas secretadas pelo endométrio foram descritas. A uteroglobina, uterocalina e uteroferrina são dependentes de P4 sendo detectadas por imunohistoquímica durante a gestação (ELLENBERGER et al., 2008).

A uteroglobina é uma proteína de baixa massa molecular com aproximadamente 10 kDa, precursora da superfamília secretoglobina, é secretada pelo endométrio e sua secreção é dependente de progesterona (BEIER, 1968). O gene que codifica esta proteína foi descrito em ratos, humanos, suínos e éguas (SINGH et al., 1988; NORDLUND-MÖLLER et al., 1990; BEIER-HELLWIG et al., 1995; SAGAL; NIETO, 1998). Existem pelo menos dois genes codificadores da uteroglobina no útero de éguas, sendo que o mais expresso está presente durante a luteólise (MÜLLER-SCHOETTLE et al. 2002; QUINN et al. 2007). Em equinos, é encontrada nas secreções uterinas durante a fase lútea, porém foi detectada em pulmão, útero e próstata nesta espécie (BEIER-HELLWIG et al., 1995; MÜLLER-SCHÖTTLE et al., 2005). A uteroglobina tem sítio de ligação lipofílico que se liga a eicosanoides como a PGF2 α e poderia influenciar na receptividade endometrial e implantação do embrião (VON DER DECKEN et al., 2005; MUKHERJEE; ZHANG; CHILTON, 2007).

A uterocalina ou P19 é uma das principais proteínas relacionadas com o útero, nutrição e gestação, sendo mais abundantes na fase de diestro e início da gestação e produzidas pelas células glandulares do endométrio (CROSSRTT et al., 1998). É uma proteína altamente catiônica (pI ~ 9.4), o que justifica sua alta afinidade de ligação na cápsula do embrião equino. São secretadas por glândulas endometriais desde a fase lútea até aproximadamente 25 dias de gestação (ELLENBERGER et al., 2008). As secreções de uterocalina foram mais altas durante o pico de produção de P4 pelo corpo lúteo primário e depois diminuiu. Um aumento ocorre novamente quando os cálices endometriais se formam e diminuindo quando os cálices começaram a degenerar (STEWART; KENNEDY; SUIRE, 2000; SUIRE et al., 2001). Estes resultados sugerem que a uterocalina é uma proteína transportadora de nutrientes para o embrião, de pequenas moléculas hidrofóbicas como os esteroides e eicosanoides que conduzem vitaminas e minerais através da cápsula e do saco vitelínico

(STEWART; KENNEDY; SUIRE, 2000; CROSSETT et al., 2005; SUIRE et al., 2001; KENNEDY, 2004). A função da uterocalina pode ser como um fator materno necessário para sustentar o embrião durante a gestação, ou pode ser incorporada à cápsula embrionária (QUINN et al., 2006).

A concentração de uterocalina varia ao longo da gestação sendo que há maior expressão no início da gestação e durante o período de formação dos cálices endometriais (ELLENBERGER et al., 2008). A incorporação da uterocalina à cápsula pode explicar o aumento do peso dessa estrutura durante o período de maior migração embrionária (ORIOLE; SHAROM; BETTERIDGE, 1993). A carga positiva desta proteína facilita a sua ligação com os resíduos de ácido siálico carregados negativamente na cápsula embrionária (ORIOLE; SHAROM; BETTERIDGE, 1993; CROSSETT; ALLEN; STEWART, 1996). A suplementação de uterocalina no meio de produção de embriões *in vitro* tem efeito positivo na formação da cápsula, mas não altera os baixos resultados das clivagens iniciais após a transferência para as receptoras (SMITS et al., 2012).

Em éguas gestantes quando, PGF2 α apresentaram menores concentrações de uterocalina, indicando que a secreção da proteína é mantida pela progesterona (SUIRE et al., 2001). Já em éguas idosas, com degeneração endometrial e alto padrão de glândulas anormais, a uterocalina é secretada de forma assíncrona contribuindo para a morte embrionária precoce (STEWART et al., 2000; HOFFMANN et al., 2003).

A uteroferrina é outra proteína também secretada pelas glândulas endometriais a partir do dia 16° até 72° dias da gestação e é também dependente das secreções de progesterona (ELLENBERGER et al., 2008). São pertencentes ao grupo de enzimas fosfatase ácida e com massa molecular de 35 kDa (MCDOWELL et al., 1982). A função da uteroferrina é transportar ferro através das células do trofoblasto ou via membranas de vesículas celulares (WOODING et al., 2000, 2001). A uteroferrina não está elevada durante toda a gestação. A formação de cálices endometriais estimula um aumento no estrogênio sérico que é sugerido como fator estimulador da produção uterina de uteroferrina. Em éguas ovariectomizadas, a administração de progesterona aumenta as secreções uterinas de uteroferrina e essa secreção também foi amplificada pelo estrogênio (MCDOWELL; SHARP; GRUBAUGH, 1987).

O crescimento e desenvolvimento embrionários até a implantação são mantidos por secreções endometriais denominada histotrofo (Crossett et al., 1996). Os aminoácidos de origem materna são essenciais para a síntese de proteínas, funções celulares e nutrição do embrião nos primeiros dias de vida (VAN WINKLE 2001; HYDE et al. 2003; MARTIN et al. 2003; BAZER et al. 2015). Os transportadores de aminoácidos nas membranas do endométrio e concepto são expressos no início da gestação. O embrião é dependente dos fatores histotróficos nos primeiros 40 dias, sendo assim as membranas do concepto recrutam transportadores de aminoácidos para o fornecimento de nutrientes necessários para o crescimento embrionário e desenvolvimento placentário (GIBSON et al., 2018).

Existem algumas descrições sobre proteínas das células endometriais de éguas cultivadas "*in vitro*", colhidas 12 a 14 dias após a ovulação, foram classificadas com ponto isoelétrico entre 5,5 a 6,5 e massa molecular de 22 e 60 Kda (MCDOWELL et al., 2004). As apolipoproteínas foram identificadas por transcriptômica e proteômica no endométrio e embrião equino, sendo mais um grupo de proteínas atribuídas a nutrição do embrião e ao transporte de lipídeos (KLEIN; TROEDSSON, 2011; SWEGEN et al., 2017).

Éguas gestantes ou cíclicas apresentam proteínas com diferentes abundâncias. As proteínas identificadas foram relacionadas com o transporte de lipídeos através da cápsula e do concepto (uterocalina), motilidade uterina (ACTB, CAPZB), metabolismo e geração de ATP (ARK1A1, IDH1, ENO1, CKB), tolerância imunológica materna (FGB, HP, GC), proliferação e diferenciação celular (14-3-3, CLIC1, HSPA8, HSP90AA1) e angiogênese (HP, CLIC1). Algumas alterações como degeneração endometrial crônica podem causar deficiência na produção histotrófica durante o período pré-implantação e acarretar perda embrionária (MORRIS and ALLEN 2002; ALLEN et al. 2007).

Há algumas hipóteses de prováveis proteínas que estão relacionadas com as alterações no ambiente uterino antes da entrada do concepto no útero. A presença do concepto muda o ambiente uterino, os vasos sanguíneos uterinos aumentam de calibre, o número de células diminui e apresenta material histotrófico entre as dobras uterinas. A investigação de proteínas durante a fase de estro e diestro de éguas identificou 10 proteínas relevantes. Estas proteínas foram relacionadas com defesa, resposta inflamatória e imunológica, durante o

estrogeno, e atividades de transporte de pequenas moléculas e resposta imune (MALONEY, et al., 2018).

As proteínas do fluido uterino de éguas inseminadas e colhido no 5º dias após a ovulação são relacionadas com o metabolismo de ferro e a tolerância imunológica. Provavelmente um mecanismo de sinalização do sistema imunológico ao reconhecimento materno (LANCHEROS-BUITRAGO et al., 2019). Assim como as proteínas reguladoras da síntese de prostaglandina estão presentes no reconhecimento materno da gestação prostaglandina redutase 1 (PTGR1), glutathione transferase 1 (GSTP1) e anexina A1 (ANXA1) (SMITS et al., 2018). No 7º dia após ovulação algumas proteínas são mais abundantes em éguas gestantes, relacionadas com o transporte de lipídios através da cápsula, motilidade uterina, metabolismo e geração de ATP, tolerância imunológica materna, proliferação celular e diferenciação e angiogênese (CAMOZZATO et al., 2019; BASTOS et al., 2019). A ceruplasmina é uma proteína de resposta positiva a fase aguda da inflamação. Já as proteínas serotransferrina e a albumina têm respostas opostas ao da ceruplasmina. Estão envolvidas no mesmo processo biológico responsável pela homeostase celular de íons de ferro, função de ligação e podem ser encontrados em exossomos (GRUYS et al., 2005; LANCHEROS-BUITRAGO et al., 2019). O aumento dos níveis séricos de ceruplasmina está associado com o estresse oxidativo, manutenção e controle homeostase do processo redox e inflamatório (SKARŽYŃSKA et al., 2018).

Alterações no proteoma do fluido uterino durante o desenvolvimento embrionário inicial em éguas estão relacionadas com a presença do conceito, sugerindo que podem ser importantes para o desenvolvimento embrionário e reconhecimento materno da gestação (BASTOS et al., 2018). Alguns estudos estão contribuindo para a compreensão do reconhecimento materno da gestação em equinos, mas até neste momento continuam incertos quais os fatores envolvidos neste processo.

REFERÊNCIAS*

ABABNEH, M. M.; TROEDSSON, M. H.; MICHELSON, J. R.; SEGUIN, B. E.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

Partial characterization of an equine conceptus prostaglandin inhibitory factor. **Journal Reproduction Fertility Supplementary**, v. 56, , p. 607–613, 2000.

ALLEN, W. R. The Physiology of Early Pregnancy in the Mare. **Proc. Annu. Conv. Am. Assoc. Equine Practnr**, p. 338–354, 2000.

ALLEN, W. R. Luteal Deficiency and Embryo Mortality in the Mare. **Reproductive Domestic Animal**, v. 36, p. 121–131, 2001.

ALLEN, W. R.; STEWART, F. Equine placentation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 13, p. 623–634, 2001.

ALLEN, W. R.; WILSHER, S. A review of implantation and early placentation in the mare. **Placenta**, v. 30, n. 12, p. 1005–15, 2009.

ARAR, S.; CHAN, K. H.; QUINN, B. A.; WAELCHLI, R. O.; HAYES, M. A.; BETTERIDGE, K. J.; MONTEIRO, M. A. Desialylation of core type 1 O-glycan in the equine embryonic capsule coincides with immobilization of the conceptus in the uterus. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 8, p. 1110–1115, 2007.

ATLI, M. O.; KURAR, E.; KAYIS, S. A.; ASLAN, S.; SEMACAN, A.; CELIK, S.; GUZELOGLU, A. Evaluation of genes involved in prostaglandin action in equine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 1–2, p. 124–132, 2010.

AURICH, C.; BUDIK, S. Expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandins in early equine embryos. **in: Proceedings of a Workshop on Maternal Recognition of Pregnancy in the Mare III.**, p. 31–32, 2004.

AURICH, C.; BUDIK, S. Early pregnancy in the horse revisited – does exception prove the rule? **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 50, 2015.

BAE, S. E.; WATSON, E. D. A light microscopic and ultrastructural study on the presence and location of oxytocin in the equine endometrium. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 909–921, 2003.

BALL, B. A. Embryonic loss in mares. Incidence, possible causes, and diagnostic considerations. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 4, n. 2, p. 263–290, 1988.

BALL, B. A.; LITTLE, T. V.; HILLMAN, R. B.; WOODS, G. L. Pregnancy rates at Days 2 and 14 and estimated embryonic loss rates prior to day 14 in normal and subfertile mares. **Theriogenology**, v. 26, n. 5, p. 611–619, 1986.

BARUA, S.; MACEDO A.; KOLB, D. S.; WYNNE-EDWARDS, K. E.; KLEIN, C. Milk-fat globule epidermal growth factor 8 (MFGE8) is expressed at the embryo-fetal-maternal interface in equine pregnancy. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, p. 585-590, 2018.

BASTOS, H. B. A.; MARTINEZ, M. N.; CAMOZZATO, G. C.; ESTRADÉ, M. J.; BARROS, E.; VITAL, C. E.; VIDIGAL, P. M. P.; MEIKLE, A.; JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Proteomic profile of histotroph during early embryo development in mares. **Theriogenology**, v. 125, p. 224–235, 2018.

BATTUT, I.; COLCHEN, S.; FIENI, F.; TAINTURIER, D.; BRUYAS, J. F. Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. **Equine veterinary journal. Supplement**, v. 25, n. 25, p. 60–62, 1998.

BAZER, F. W.; OTT, T. L.; SPENCER, T. E. Endocrinology of the transition from recurring estrous cycles to establishment of pregnancy in sub-primate mammals. In: **In: Bazer F.W. (eds) Endocrinology of Pregnancy. Contemporary Endocrinology**, Humana Pre ed. [s.l: s.n.]p. 1998.

BAZER, F. W.; THATCHER, W. W. Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F_{2α} by the uterine endometrium. **Prostaglandins**, v. 14, n. 2, p. 397–401, 1977.

BEHRENDT-ADAM, C. Y.; ADAMS, M. H.; SIMPSON, K. S.; MCDOWELL, K. J. Oxytocin-Neurophysin I M Rna Abundance in Equine. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 16, n. 3, p. 183–192, 1999.

BEIER-HELLWIG, K.; KREMER, H.; BONN, B.; LINDER, D.; BANDER, H.; BEIER, H. M. Partial Sequencing and Identification of Three Proteins from Equine Uterine Secretion Regulated by Progesterone. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 30, p. 295–298, 1995.

BERGLUND, L. A.; SHARP, D. C.; VERNON, M. W.; THATCHER, W. W. Effect of pregnancy and collection technique on prostaglandin F in the uterine lumen of Pony mares. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 32, p. 335–341, 1982.

BERRIDGE, M. J.; IRVINE, R. F. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. **Nature**, v. 312, n. 22, p. 315–321, 1984.

BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise - revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 824–840, 2006.

BETTERIDGE, K. J. Comparative aspects of equine embryonic development. p. 691–702, 2000.

BETTERIDGE, K. J. Equine embryology: An inventory of unanswered questions. **Theriogenology**, v. 68, p. S9–S21, 2007.

BETTERIDGE, K. J.; EAGLESOME, M. D.; MITCHELL, D.; FLOOD, P. F.; BERIAULT, R. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. **Journal of anatomy**, v. 135, n. Pt 1, p. 191–209, 1982.

BIRTS, C. N.; BARTON, C. H.; WILTON, D. C. A catalytically independent physiological function for human acute phase protein group IIA phospholipase A2: cellular uptake facilitates cell debris removal. **Journal Biology Chemical**. v. 283, p. 5034–5045, 2007.

BOCCA, S. M.; ANDERSON, S.; AMAKER, B.; SWANSON, R. J.; FRANCHI, A.; LATTANZIO, F.; OEHNINGER, S. Milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8): a novel protein in the mammalian endometrium with putative roles in implantation and placentation. **Placenta**, v. 33, n. 10, p. 795-802, 2012.

BOERBOOM, D.; BROWN, K. A.; VAILLANCOURT, D.; POITRAS, P.; GOFF, A. K.; WATANABE, K.; DORÉ, M.; SIROIS, J. Expression of Key Prostaglandin Synthases in Equine Endometrium During Late Diestrus and Early Pregnancy1. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 2, p. 391–399, 2004.

BOGLÁRKA, V.; ANDRÁS, G.; MARGIT, K.; FERENC, B.; ÁDÁM, B.; GYÖRGY, T. H.; OTTÓ, S. Equine alpha-fetoprotein levels in Lipizzaner mares with normal pregnancies and with pregnancy loss **Theriogenology**. v. 84, p. 1581–1586, 2015.

BURGHARDT, R. C.; BURGHARDT, J. R.; TAYLOR, J. D.; REEDER, A. T.; NGUEN, B. T.; SPENCER, T. E. Enhanced focal adhesion assembly reflects increased mechanosensation and mechanotransduction at maternal-conceptus interface and uterine wall during ovine pregnancy. **Reproduction**. v. 137, n. 3, p. 567–82. 2009.

BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C. Pregnancy: Physiology and Diagnosis. In: **Manual of Equine Reproduction**. 3 ra ed. ed. Missouri: Mosby Elsevier, 2011. p. 85–93.

BROSNAHAN, M. M.; MILLER, D. C.; ADAMS, M.; ANTCZAK, D. F. IL-22 Is Expressed by the Invasive Trophoblast of the Equine (*Equus caballus*) Chorionic Girdle. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 9, p. 4181–4187, 2012.

BYLANDER, A.; NUTU, M.; WELLANDER, R.; GOKSÖR, M.; BILLIG, H.; LARSSON, D. J. Rapid effects of progesterone on ciliary beat frequency in the mouse fallopian tube. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 48, 2010.

CAIXETA, E. S.; FAGUNDES, N. S.; CAIXETA, M. S.; PYLES, E. S. S. Desenvolvimento embrionário inicial equino-Revisão. **Revista portuguesa de ciencias veterinarias**, v. 103, n. 14, p. 25–34, 2008.

CAMOZZATO, G. C.; MARTINEZ, M. N.; BASTOS, H. B. A.; FIALA-RECHSTEINER, S.; MEIKLE, A.; JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Ultrastructural and histological characteristics of the endometrium during early embryo development in mares. **Theriogenology**. v. 1, n. 123, p.1-10, 2019.

CANISSO, I. F.; BALL, B. A.; SCOGGIN, K. E.; SQUIRES, E. L.; WILLIAMS, N. M.; TROEDSSON, M. H. Alpha-fetoprotein is present in the fetal fluids and is increased in plasma of mares with experimentally induced ascending placentitis. **Animal Reproduction Science**. v. 154, p.48–55, 2015.

CERIANI, R. L.; PETERSON, J. A.; LEE, J. Y.; MONCADA, R.; BLANK, E. W. Characterization of cell surface antigens of human mammary epithelial cells with monoclonal antibodies prepared against human milk fat globule. **Somatic Cell Genetic**, v. 9, n. 4, p. 415-427, 1983.

CHALLIS, J. R. G.; MATTHEWS, S. G.; GIBB, W.; LYE, S. J. Endocrine and paracrine of birth at term and preterm. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 5, p. 514–550, 2000.

CHU, J. W. K.; SHAROM, F. J.; ORIOL, J. G.; BETTERIDGE, K. J.; CLEAVER, B. D.; SHARP, D. C. Biochemical changes in the equine capsule following prostaglandin- induced pregnancy failure. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, n. 3, p. 286–295, 1997.

CHUAI, M.; WEIJER, C. J. Regulation of cell migration during chick gastrulation. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 19, n. 4, p. 343–349, 2009.

COCHET, M.; VAIMAN, D.; LEFÈVRE, F. Novel interferon delta genes in mammals: Cloning of one gene from the sheep, two genes expressed by the horse conceptus and discovery of related sequences in several taxa by genomic database screening. **Gene**, v. 433, n. 1–2, p. 88–99, 2009.

CROSSETT, B., ALLEN, W. R. AND STEWART, F. A 19 kDa protein secreted by the endometrium of the mare is a novel member of the lipocalin family. **Biochemical Journal**. v. 320, p. 137-143, 1996.

CROSSETT, B.; SUIRE, S.; HERRLER, A.; ALLEN, W. R.; STEWART, F. Transfer of a Uterine Lipocalin from the Endometrium of the Mare to the Developing Equine Conceptus1. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 3, p. 483–490, 1998.

CRUMP, A.; DONALDSON, W. L.; MILLER, J.; KYDD, J. H.; ALLEN, W. R.; ANTCZAK, D. F. Expression of major histocompatibility complex (MHC) antigens on horse trophoblast. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 35, p. 379–388, 1987.

DE RUIJTER-VILLANI, M.; VAN TOL, H. T. A.; STOUT, T. A. E. Effect of pregnancy on endometrial expression of luteolytic pathway components in the mare. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 5, p. 834–845, 2015.

DEGRELLE, S. A.; LÊCAO, K. A.; HEYMAN, Y.; EVERTS, R. E.; CAMPION, E.; RICHARD, C.; DUCROIX-CRÉPY, C.; TIAN, X. C.; LEWIN, H. A.; RENARD, J. P.; ROBERT-GRANIÉ, C.; HUE, I. A small set of extra-embryonic genes defines a new landmark for bovine embryo staging. **Reproduction**, v. 141, n. 1, p. 79–89, 2011.

DENKER, H. W. .; BETTERIDGE, K. J. .; SIROIS, J. S. Shedding of the capsule and proteinase activity in the horse. **Journal Reproduction and fertility. Supplement**, v. 35, p. 708, 1987.

DENKER HW. Structural Dynamics and Function of Early Embryonic Coats. **Cells Tissues Organs**, n. 166, p. 180–207, 2000.

DONALDSON, W. L.; ZHANG, C. H.; ORIOL, J. G.; ANTCZAK, D. F. Invasive equine trophoblast expresses conventional class I major histocompatibility complex antigens. **Development**, v. 110, n. 1, p. 63–71, 1990.

DOUGLAS, R. H.; GINTHER, O. J. Concentration of prostaglandins F in uterine venous plasma of anesthetized mares during the estrous cycle and early

pregnancy. **Prostaglandins**, v. 11, n. 2, p. 251–260, 1976.

EALY, A. D.; EROH, M. L.; SHARP, D. C. Prostaglandin H synthase Type 2 is differentially expressed in endometrium based on pregnancy status in pony mares and responds to oxytocin and conceptus secretions in explant culture. **Animal reproduction science**, v. 117, n. 1–2, p. 99–195, 2010.

ELLENBERGER, C.; WILSHER, S.; ALLEN, W. R.; HOFFMANN, C.; KÖLLING, M.; BAZER, F. W.; KLUG, J.; SCHOON, D.; SCHOON, H. A. Immunolocalisation of the uterine secretory proteins uterocalin, uteroferrin and uteroglobin in the mare's uterus and placenta throughout pregnancy. **Theriogenology**, v. 70, n. 5, p. 746–757, 2008.

ENDERS, A. C.; LIU, I. K. Lodgement of the equine blastocyst in the uterus from fixation through endometrial cup formation. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 44, p. 427–438, 1991a.

ENDERS, A. C.; LIU, I. K. M. Trophoblast- Uterine Interactions During Equine Chorionic Girdle Cell Maturation , Migration , and Transformation. **The american journal of anatomy**, v. 192, p. 366–381, 1991b.

EVANS, H. M.; L, E.; GUSTUS; SIMPSON, M. E. Concentration of the gonadotropin hormone in pregnant mare's serum. **Journal of experimental medicine**, v. 58, n. 5, p. 569–574, 1988.

EVANS, J.; HUTCHISON, J.; SALAMONSEN, L. AL.; GREENING, D. W. Proteomic insights into endometrial receptivity and embryo-endometrial epithelium interaction for implantation; critical determinants of fertility. **Proteomics**, v. 20, p. 1, 2019.

FRANCHI, A.; BOCCA, S.; ANDERSON, S.; RIGGS, R.; OEHNINGER, S. Expression of milk fat globule EGF-factor 8 (MFG-E8) mRNA and protein in the human endometrium and its regulation by prolactin. **Molecular Human Reproduction**, v. 17, n. 6, p. 360-371, 2011.

GADELLA, B. M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.229-236, 2008.

FLOOD, P. F.; JONG, A.; BETTERIDGE, K. J. The location of eggs retained in the oviducts of mares. **Journal of Reproduction and fertility**, v. 57, n. 2, p. 291–294, 1979.

GAIVÃO, M. M. F.; RAMBAGS, B. P. B.; STOUT, T. A. E. Gastrulation and the establishment of the three germ layers in the early horse conceptus. **Theriogenology**. p. 1–12, 2014.

GALBRAITH, C. G.; YAMADA, K. M.; SHEETZ, M. P. The relationship between force and focal complex development. **Journal Cell Biology**. v. 159, n. 4, p. 695–705, 2002.

GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; KOT, K.; GINTHER, O. J. Factor related to the time of fixation of the conceptus in mares. **Theriogenology**, n. 96, p. 1171–1180, 1996.

GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; TORRES, C. A. A.; GINTHER, O. J. Effect of PGE₂ on uterine contractility and tone in mares. **Theriogenology**, v. 50, n. 7, p. 989–999, 1998.

GEISERT, R. D.; WHYTE, J. J.; MEYER, A. E.; MATHEW, D. J.; JUÁREZ, M. R.; LUCY, M. C.; PRATHER, R. S.; SPENCER, T. E. Rapid conceptus elongation in the pig: An interleukin 1 beta 2 and estrogen-regulated phenomenon. **Molecular Reproduction Development**. v. 84, p. 760-774, 2017.

GILBERT, S. F. Early embryonic development. In: **Developmental biology**. Ninth edit ed. Sunderland, MA: S.F. Sinauer Associates, Inc, 2010. p. 175–325.

GIBSON, C.; RUIJTER-VILLANI, M.; RIETVELD, J.; STOUT, T. A. E. Amino acid transporter expression in the endometrium and conceptus membranes during early equine pregnancy **Reproduction, Fertility and Development**, 2018.

GIBSON, C.; RUIJTER-VILLANI, M.; RIETVELD, J.; STOUT, T. A. E. Expression of glucose transporters in the endometrium and early conceptus membranes of the horse. **Placenta**. v. 68, p. 23–32, 2018.

GINTHER, O. J. Mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v. 19, n. 4, p. 603–611, 1983a.

GINTHER, O. J. Fixation and orientation of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v. 19, n. 4, p. 613–623, 1983b.

GINTHER, O. J. Mobility of twin embryonic vesicles in mares. **Theriogenology**, v. 22, n. 1, p. 83–95, 1984.

GINTHER, O. J. Embryonic loss in mares: Incidence, time of occurrence, and hormonal involvement. **Theriogenology**, v. 23, n. 1, p. 77–89, 1985a.

GINTHER, O. J. Dynamic physical interactions between the equine embryo and uterus. **Equine Veterinary Journal**, v. 17, n. S3, p. 41–47, 1985b.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. Second ed, ed. WI, USA: Equiservices Publishing, 1992.

GOFF, A. K.; LEDUC, S.; POITRAS, P.; VAILLANCOURT, D. Steroid synthesis by equine conceptuses between days 7 and 14 and endometrial steroid metabolism. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 10, n. 3, p. 229–236, 1993.

GOFF, A.; PONTBRIAND, D.; SIROIS, J. Oxytocin stimulation of plasma 15-keto-13, 14-dihydro prostaglandin F-2 alpha during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. **Journal of reproduction and fertility, Supplemant**, v. 35, p. 253–260, 1987.

GROSS, T. S.; THATCHER, W. W.; HANSEN, P. J.; JOHNSON, J. W.; HELMER, S. D. Presence of an intracellular endometrial inhibitor of prostaglandin synthesis during early pregnancy in the cow. **Prostaglandins**, v. 35, n. 3, p. 359–378, 1988.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J. M.; NIEWOLD, T. A.; KOOPMANS, S. J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **J Zhejiang Journal of Zhejiang University Science B**. v. 6, n. 11, p. 1045–56, 2005.

HABENICHT, A. J. R.; GOERIG, M.; GRULICH, J.; ROTHE, D.; GRONWALD, R.; LOTH, U.; SCHETTLER, G.; KOMMERELL, B.; ROSS, R. Human platelet-derived growth factor stimulates prostaglandin synthesis by activation and by rapid de novo synthesis of cyclooxygenase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 75, n. 4, p. 1381–1387, 1985.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Monole, 2004.

HAYES, M. A.; QUINN, B. A.; KEIRSTEAD, N. D.; KATAVOLOS, P.; WAELCHLI, R.O.; BETTERIDGE, K. J. Proteins Associated With the Early Intrauterine Equine Conceptus. **Reproduction Domestic Animal**. v. 43, n. 2, p. 232–237. 2008.

HANDLER, J.; KÖNIGSHOFER, M.; KINDAHL, H.; SCHAMS, D.; AURICH, C. Secretion patterns of oxytocin and PGF2 α -metabolite in response to cervical dilatation in cyclic mares. **Theriogenology**, v. 59, n. 5–6, p. 1381–1391, 2003.

HERRLER, A.; PELL, J. M.; ALLEN, W. R.; BEIER, H. M.; STEWART, F. Horse Conceptuses Secrete Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 31. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1804–1811, 2000.

HINRICHS, K.; SERTICH, P. L.; PALMER, E.; KENNEY, R. M. Establishment and maintenance of pregnancy after embryo transfer in ovariectomized mares treated with progesterone. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 80, n. 2, p. 395–401, 1987.

HOFFMANN, C.; BAZER, F. W.; KLUG, J.; ALLEN, W. R.; AUPPERLE, H.; ELLENBERGER, C.; SCHOON, H. A. Morpho-functional studies regarding the pathogenesis of equine endometrosis with special emphasis on uterine secretions-preliminary results. **Pferdeheilkunde**, v. 19, n. 6, p. 666–669, 2003.

HOLTAN, D. W.; HOUGHTON, E.; SILVER, M.; FOWDEN, A. L.; OUSEY, J.; ROSSDALE, P. D. Plasma progestagens in the mare, fetus and newborn foal. **Journal of reproductive and fertility. Supplement**, v. 44, p. 517–528, 1991.

IDKOWIAK, J.; WEISHEIT, G.; PLITZNER, J.; VIEBAHN, C. Hypoblast controls mesoderm generation and axial patterning in the gastrulating rabbit embryo. **Development Genes and Evolution**, v. 214, n. 12, p. 591–605, 2004.

KASHYAP, R.; JAIN, A.; NALESNIK, M.; CARR., B; BARNES, J.; VARGAS, H. E. Clinical significance of elevated alpha-fetoprotein in adults and children. **Digestive Diseases and Sciences**. v. 46, p. 1709–13, 2001.

KASTELIC, J. P.; ADAMS, G. P.; GINTHER, O. J. Role of progesterone in mobility, fixation, orientation, and survival of the equine embryonic vesicle. **Theriogenology**, v. 27, n. 4, p. 655–663, 1987.

KATZ, B. Z.; ZAMIR, E.; BERSHADSKY, A.; KAM, Z.; YAMADA, K. M.; GEIGER, B. Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. **Molecular Biology Cell**. v. 11, n. 3, p. 1047–60, 2000.

KHALIFEH-SOLTANI, A.; MCKLEROY, W.; SAKUMA, S.; CHEUNG, Y. Y.; THARP, K.; QIU, Y.; TURNER, S. M.; CHAWLA, A.; STAHL, A.; ATABAI, K.

Mfge8 promotes obesity by mediating the uptake of dietary fats and serum fatty acids. **Nature Medicine**. v. 20, n. 2, p. 175–183, 2014.

KENNEDY, M. W. Uterocalin – Provider of Essential Lipids and Amino Acids To the Pre-Placentation Equine Conceptus. **in: Proceedings of a Workshop on Maternal Recognition of Pregnancy in the Mare III.**, n. 16, p. 53–56, 2004.

KINDAHL, H.; KNUDSEN, O.; MADEJ, A.; EDQVIST, L. E. Progesterone, prostaglandin F-2 alpha, PMSG and oestrone sulphate during early pregnancy in the mare. **Journal of Reproductive and Fertility**, v. 32, p. 353–359, 1982.

KLEIN, C.; SCOGGIN, K. E.; AELY, A. D.; TROEDSSON, M. H. T. Transcriptional Profiling of Equine Endometrium During the Time of Maternal recognition of pregnancy. **Biology of reproduction**, v. 83, n. 1, p. 102–103, 2010.

KLEIN, C.; TROEDSSON, M. H. T. Transcriptional Profiling of Equine Conceptuses Reveals New Aspects of Embryo-Maternal Communication in the Horse1. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 5, p. 872–885, 2011.

KLEIN, C. Pregnancy Recognition and Implantation of the Conceptus in the Mare. Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals: Tribute to 45 Year Anniversary of Roger V. Short's "Maternal Recognition of Pregnancy", **Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology**. 216, 2015.

KLEIN, C Maternal Recognition of Pregnancy in the Context of Equine Embryo Transfer. **Journal of Equine Veterinary Science** v. 41, p. 22–28, 2016.

KLEIN, C.; BAUERSACHS, S.; ULBRICH, S. E.; EINSPANIER, R.; MEYER, H. H.; SCHMIDT, S. E.; REICHENBACH, H. D.; VERMEHREN, M.; SINOWATZ, F.; BLUM, H.; WOLF, E. Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the preattachment period. **Biology Reproduction**. v. 74, n. 2, p. 253-264, 2006.

KLOHONATZ, K. M.; NULTON, L. C.; HESS, A. M.; BOUMA, G. J.; BRUEMMER, J. E. The role of embryo contact and focal adhesions during maternal recognition of pregnancy. **Plos One**. 14 (3): e0213322. 2019.

LANCHEROS-BUITRAGO, J.; RODRIGUEZ-VILLAMIL, P.; GREGORY, J.; BASTOS, H.; CAMACHO, C. A.; CABALLEROS, J. E.; CAZALES, N.; BARROS, E.; JOSÉ DE JESUS SILVA M.; PIMENTEL. A.; MATTOS, R. C. Ceruloplasmin, serotransferrin and albumin presented different abundance in mares' uterine fluid five days after insemination, **Theriogenology**. 2019.

LANE, M.; O'DONOVAN, M. K.; SQUIRES, E. L.; SEIDEL, G. E.; GARDNER, D. K. Assessment of metabolism of equine morulae and blastocysts. **Molecular Reproduction Development**. v. 59, p. 33–37, 2001.

LEISINGER, C. A.; MEDINA, V.; MARKLE, M. L.; PACCAMONTI, D. L.; PINTO, C. R. F. Morphological evaluation of Day 8 embryos developed during induced aluteal cycles in the mare. **Theriogenology**, v. 105, p. 178–183, 2018.

LEITH, G. S.; GINTHER, O. J. Characterization of intrauterine mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v. 22, n. 4, p. 401–8, 1984.

LEITH, G. S.; GINTHER, O. J. Mobility of the conceptus and uterine contractions in the mare. **Theriogenology**, v. 24, n. 6, p. 701–711, 1985.

LYE, S. J.; OU, C. W.; TEOH, T. G.; ERB, G.; STEVENS, Y.; CASPER, R.; PATEL, F. A.; CHALLIS, J. R. G. The molecular basis of labour and tocolysis. **Fetal and Maternal Medicine Review**, v. 10, n. 3, p. 121–136, 1998.

MALONEY, S. E.; KHAN, F. A.; CHENIER, T. S.; AMORIM, M. D.; HAYES, M. A.; SCHOLTZ, E. L. A comparison of the uterine proteome of mares in oestrus and diestrus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 3, p. 473–479, 2018.

MORAES, J. G. N.; BEHURA, S. K.; BISHOP, J. V.; HANSEN, T. R.; GEARY, T. W.; SPENCER, T. E. Analysis of the Uterine Lumen in Fertility-Classified Heifers: II. Proteins and Metabolites. **Biology Reproduction**, v. 102, p. 571–587, 2020.

MULLER-SCHOTTLE, F.; BOGUSZ, A.; GROTZINGER, J.; HERRLER, A.; KRUSCHE, C. A.; BEIER-HELLWIG, K.; BEIER, H. M. Full-length complementary DNA and the derived amino acid sequence of horse uteroglobin. **Biology Reproduction**, v. 66, p. 1723–1728, 2002.

MCCRACKEN, J. A.; GLEW, M. E.; SCARAMUZZI, R. J. Corpus luteum regression induced by prostaglandin F2 α . **Obstetrical and Gynecological Survey**, v. 25, n. 11, p. 1076–1077, 1970.

MCDOWELL, K. J.; SHARP, D. C.; FAZLEABAS, A.; ROBERTS, R. M.; BAZER, F. W. Partial characterization of the equine uteroferrin-like protein. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 32, p. 329–34, 1982.

MCDOWELL, K. J.; SHARP, D. C.; FAZLEABAS, A. T.; ROBERTS, R. M. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins synthesized and released by conceptuses and endometria from pony mares. **Reproduction**, v. 89, n. 1, p. 107–115, 2004.

MCDOWELL, K. J.; SHARP, D. C.; GRUBAUGH, W. Comparison of progesterone and progesterone + oestrogen on total and specific uterine proteins in pony mares. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 35, p. 335–42, 1987.

MCDOWELL, K. J.; SHARP, D. C.; GRUBAUGH, W.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. **Biology of reproduction**, v. 39, n. 2, p. 340–8, 1988.

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine reproduction**. John Wiley ed. [s.l.: s.n.]

MUKHERJEE, A. B.; ZHANG, Z.; CHILTON, B. S. Uteroglobin: A steroid-inducible immunomodulatory protein that founded the Secretoglobin superfamily. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 7, p. 707–725, 2007.

MÜLLER-SCHÖTTLE, F.; BOGUSZ, A.; GRÖTZINGER, J.; HERRLER, A.; KRUSCHE, C. A.; BEIER-HELLWIG, K.; BEIER, H. M. Full-Length Complementary DNA and the Derived Amino Acid Sequence of Horse Uteroglobin1. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 6, p. 1723–1728, 2005.

MYERS, D. C.; SEPICH, D. S.; SOLNICA-KREZEL, L. Convergence and extension in vertebrate gastrulae: Cell movements according to or in search of identity? **Trends in Genetics**, v. 18, n. 9, p. 447–455, 2002.

NARASIMHA, M.; LEPTIN, M. Cell movements during gastrulation: Come in and be induced. **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 169–172, 2000.

NEEDLEMAN, P.; TURK, J.; JAKSCHIK, B. A.; MORRISON, A. R.; LEFKOWITH, J. B. Arachidonic acid metabolism. **Annual review of biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 69–102, 1986.

NORDLUND-MÖLLER, L.; ANDERSSON, O.; AHLGREN, R.; SCHILLING, J.; GILLNER, M.; GUSTAFSSON, J. Å.; LUND, J. Cloning , Structure , and Expression of rat binding protein for polychlorinated biphenyls. **The Journal of biological chemistry**, v. 265, n. 21, p. 12690–12693, 1990.

ORIOLO, J. G.; BETTERIDGE, K. J.; CLARKE, A. J.; SHAROM, F. J. Mucin- like glycoproteins in the equine embryonic capsule. **Molecular Reproduction and Development**, v. 34, n. 3, p. 255–265, 1993.

ORIOLO, J. G.; SHAROM, F. J.; BETTERIDGE, K. J. Developmentally regulated changes in the glycoproteins of the equine embryonic capsule. **Journal of reproduction and fertility**, v. 99, n. 2, p. 653–664, 1993.

OZEL, C.; GUZELOGLU, A.; HITIT, M.; ATLI, O. M.; KURAR, E.; KAYIS, S. A. Expressão das isoformas de fofolipase A2 em endométrio equino durante o ciclo de estro e primeiros gravídeos. **Reprodução, fertilidade e desenvolvimento**, v. 27, n. 1, p. 148, 2014.

QUINN, B. A.; CASWELL, D. E.; LILLIE, B. N.; WAELCHLI, R. O.; BETTERIDGE, K. J.; HAYES, M. A. The GM2-activator protein is a major protein expressed by the encapsulated equine trophoblast. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1–4, p. 391–394, 2006.

QUINN, B. A.; HAYES, M. A.; WAELCHLI, R. O.; KENNEDY, M. W.; BETTERIDGE, K. J. Changes in major proteins in the embryonic capsule during immobilization (fixation) of the conceptus in the third week of pregnancy in the mare. **Reproduction**, v. 134, n. 1, p. 161–170, 2007.

RAESIDE, J. I.; HEATHER, L. C.; RENAULD, R. L.; WAELCHLI, R. O.; BETTERIDGE, K. J. Estrogen Metabolism in the Equine Conceptus and Endometrium During Early Pregnancy in Relation to Estrogen Concentrations in Yolk-Sac Fluid. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1120–1127, 2004.

ROBERTS, R. M.; XIE, S.; MATHIALAGAN, N. Maternal Recognition of Pregnancy. **Biology of reproduction**, v. 54, p. 294–302, 1996.

SAGAL, R. G.; NIETO, A. Cloning and sequencing of the cDNA coding for pig pre-uteroglobin/clara cell10 kDa protein. **Biochemistry and molecular biology international**, v. 45, n. 1, p. 205–213, 1998.

SIMPSON, K. S.; ADAMS, M. H.; BEHRENDT-ADAM, C. Y.; BAKER, C. B.; MCDOWELL, K. J. Differential gene expression in day 12 and day 15 equine conceptuses. **Journal of reproduction and fertility**. v. 56, p. 539–547, 2000.

SHARP, D. C.; THATCHER, M.; SALUTE, M. E.; FUCHS, A. Relationship between endometrial oxytocin receptors and oxytocin induced prostaglandin F₂ α release during the oestrous cycle and early pregnancy in pony mares. **Journal of reproduction and fertility**, v. 109, p. 137–144, 1997.

SKARŻYŃSKA, E.; ZBOROWSKA, H.; JAKIMIUK, A. J.; KARLIŃSKA, M.; LISOWSKA-MYJAK, B. Variations in serum concentrations of C-reactive protein, ceruloplasmin, lactoferrin and myeloperoxidase and their interactions during normal human pregnancy and postpartum period. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 46, p. 83-7, 2018.

SHIMIZU, T.; WOLFE, L. S. Arachidonic Acid Cascade and Signal Transduction. **Journal of Neurochemistry**, v. 55, n. 1, p. 1–15, 1990.

SINGH, G.; KATYAL, S. L.; BROWN, W. E.; PHILLIPS, S.; KENNEDY, A. L.; ANTHONY, J.; SQUEGLIA, N. Amino-acid and cDNA nucleotide sequences of human Clara cell 10 kDa protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 950, n. 3, p. 329–337, 1988.

SMITS, K.; GOVAERE, J.; PEELMAN, L. J.; GOOSSENS, K.; DE GRAAF, D. C.; VERCAUTEREN, D.; VANDAELE, L.; HOOGEWIJS, M.; WYDOOGHE, E.; STOUT, T.; VAN SOOM, A. Influence of the uterine environment on the development of in vitro-produced equine embryos. **Reproduction**, v. 143, n. 2, p. 173–181, 2012.

SMITS, K.; WILLEMS, S.; VAN STEENDAM, K.; VAN DE VELDE, M.; DE LANGE, V.; VERVERS, C.; ROELS, K.; GOVAERE, J.; VAN NIEUWERBURGH, F.; PEELMAN, L.; DEFORCE, D.; VAN SOOM, A. Proteins involved in embryo-maternal interaction around the signalling of maternal recognition of pregnancy in the horse. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5249, 2018.

SOLNICA-KREZEL, L. Conserved patterns of cell movements during vertebrate gastrulation. **Current Biology**, v. 15, n. 6, p. 213–228, 2005.

SORENSEN, K.; NEELY, D. P.; READ, W.; GRAPPELL, P. M. Measurement and clinical significance of equine fetal protein in pregnant mares serum. **Journal Equine Veterinary Science**, v. 10, p. 417–21, 1990.

SQUIRES, E. L.; GINTHER, O. J. Follicular and luteal development in pregnant mares. **Journal of reproductive and fertility. Supplement**, n. 23, p. 429–433, 1975.

STARBUCK, G. R.; STOUT, T. A. E.; LAMMING, G. E.; ALLEN, W. R.; FLINT, A. P. F. Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during the oestrous cycle and early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, n. 2, p. 173–179, 1998.

STEWART, F.; ALLEN, W. R.; MOOR, R. M. Pregnant mare serum gonadotrophin: ratio of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay. **Journal of endocrinology**, v. 71, p. 371–382, 1976.

STEWART, F.; GERSTENBERG, C.; SUIRE, S.; ALLEN, W. R. Imunolocalização

de uma nova proteína (P19) no endométrio de éguas férteis e subférteis. **Journal of reproduction and fertility, Suplement**, v. 56, p. 593–599, 2000.

STEWART, F.; KENNEDY, M. W.; SUIRE, S. A novel uterine lipocalin supporting pregnancy in equids. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, n. 10, p. 1373–1378, 2000.

STOUT, T. A. E. Equine embryo transfer : review of developing potential. **Equine veterinary Journal**, v. 38, n. 5, p. 467–478, 2006.

STOUT, T. A. E. Embryo-maternal communication during the first 4 weeks of equine pregnancy. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 349–354, 2016.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. The role of oxytocin in luteolysis in the cycling mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, n. 3–4, p. 351–354, 1999.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 121, n. 5, p. 771–775, 2001.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. Prostaglandin E2 and F2 α production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. **Reproduction**, v. 123, n. 2, p. 261–268, 2002.

STOUT, T. A. E.; MEADOWS, S.; ALLEN, W. R. Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. **Animal Reproduction Science**, v. 87, n. 3–4, p. 269–281, 2005.

SUIRE, S.; STEWART, F.; BEAUCHAMP, J.; KENNEDY, M. W. Uterocalin, a lipocalin provisioning the preattachment equine conceptus: fatty acid and retinol binding properties, and structural characterization. **Biochemical Journal**, v. 356, n. 2, p. 369–376, 2001.

SWEGEN, A.; GRUPEN, C. G.; GIBB, Z.; BAKER, M. A.; DE RUIJTER-VILLANI, M.; SMITH, N. D.; STOUT, T. A. E.; AITKEN, R. J. From Peptide Masses to Pregnancy Maintenance: A Comprehensive Proteomic Analysis of The Early Equine Embryo Secretome, Blastocoel Fluid, and Capsule. **Proteomics**, v. 17, n. 17–18, p. 1–13, 2017.

TACHIBANA, Y.; SAKURAI, T.; BAI, H.; SHIOTA, K.; NAMBO, Y.; NAGAOKA, K.; IMAKAWA, K. RNA-seq analysis of equine conceptus transcripts during embryo fixation and capsule disappearance. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e114414, 2014.

TAYLOR, M. R.; COUTO, J. R.; SCALLAN, C. D.; CERIANI, R. L.; PETERSON, J. A. Lactadherin (formerly BA46), a membrane-associated glycoprotein expressed in human milk and breast carcinomas, promotes Arg- Gly-Asp (RGD)-dependent cell adhesion. **DNA Cell Biology**, v. 16, n. 7, p. 861–869. 1997.

THATCHER, W. W.; MEYER, M. D.; DANET-DESNOYERS, G. Maternal recognition of pregnancy. **Journal of reproduction and fertility. Supplement.**, v. 49, p. 15–28, 1995.

UCHIYAMA, A.; YAMADA, K.; OGINO, S.; YOKOYAMA, Y.; TAKEUCHI, Y.; UDEY, M. C.; ISHIKAWA, O.; MOTEGI, S. MFG-E8 regulates angiogenesis in cutaneous wound healing. **Animal Journal Pathology**. v. 184, n. 7, p. 1981–1990. 2014.

VEJLSTED, M. Embryo cleavage and blastulation. In: HYTTEL P, SINOWATZ F, VEJLSTED F, ET AL. (Ed.). **Essentials of domestic animal embryology**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2010. p. 68–78.

VERNON, M. W.; STRAUSS, S.; SIMONELLI, M.; ZAVY, M. T.; AFIADA, C. C. Specific PGF2 α . **Journal of reproduction and fertility, Suplement**, v. 27, p. 421–429, 1979.

VINCZE, B.; SOLYMOSI, N.; DEBNAR, V.; KÚTVÉOLGYI, G.; KRIKO, E.; WÉOLFLING, A.; SZENCI, O. Assessment of equine alpha-fetoprotein levels in mares and newborn foals in the periparturient period **Theriogenology**. v. 122, p. 53-60, 2018.

VON DER DECKEN, V.; DELBRÜCK, H.; HERRLER, A.; BEIER, H. M.; FISCHER, R.; HOFFMANN, K. M. V. Recombinant bovine uteroglobin at 1.6 Å resolution: A preliminary X-ray crystallographic analysis. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 61, n. 5, p. 499–502, 2005.

WAELECHLI, R. O.; BETTERIDGE, K. J. Osmolality of equine blastocyst fluid from day 11 to day 25 of pregnancy. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, n. 6, p. 981–988, 1996.

WATSON, E. D. Do mares possess an intracellular endometrial inhibitor of prostaglandin synthesis during early pregnancy? **Theriogenology**, v. 36, n. 1, p. 67–71, 1991.

WATSON, E. D.; SERTICH, P. L. Prostaglandin production by horse embryos and the effect of co-culture of embryos with endometrium from pregnant mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, n. 1, p. 331–336, 1989.

WEBER, J. A.; FREEMAN, D. A.; VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L. Prostaglandin E2 Secretion by Oviductal Transport-Stage Equine Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 45, n. 4, p. 540–543, 1991.

WEBER, J. A.; WOODS, G. L.; LICHTENWALNER, A. B. Relaxatory Effect of Prostaglandin E2 on Circular Smooth Muscle Isolated from the Equine Oviductal Isthmus. **Biology of Reproduction**, v. 1, p. 125–130, 1995.

WESSEL, T.; SCHUCHTER, U.; WALT, H. Ciliary motility in bovine oviducts for sensing rapid non-genomic reactions upon exposure to progesterone. **Hormone and Metabolic Research**, v. 36, n. 3, p. 136–141, 2004.

WILSHER, S.; ALLEN WR. Intrauterine administration of plant oils inhibits luteolysis in the mare. **Equine Veterinary Journal**. v. 43, n. 1, p. 99-105, 2011.

WOODING, F. B. P.; MORGAN, G.; FOWDEN, A. L.; ALLEN, W. R. Separate Sites and Mechanisms for Placental Transport of Calcium, iron and glucose in the equine placenta. **Placenta**, v. 21, p. 635–645, 2000.

WOODING, F. B. P.; MORGAN, G.; FOWDEN, A. L.; ALLEN, W. R. A structural and immunological study of chorionic gonadotrophin production by equine trophoblast girdle and cup cells. **Placenta**, v. 22, n. 8–9, p. 749–767, 2001.

ZAVY, M. T.; CLARK, W. R.; SHARP, D. C.; MICHAEL, R. R.; BAZER, F. W. Comparison of glucose, fructose, ascorbic acid and glucosephosphate isomerase enzymatic activity in uterine flushings from nonpregnant and pregnant guts and pony Mares. **Biology Reproduction**. v. 27 p. 1147–1158, 1982.